

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-17182

(P2001-17182A)

(43)公開日 平成13年1月23日(2001.1.23)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 8 G 69/36	Z A B	C 0 8 G 69/36	Z A B 4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/15		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 4
1/19		1/19	4 B 0 6 5
1/21		1/21	4 J 0 0 1
審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平11-196335

(22)出願日 平成11年7月9日(1999.7.9)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年3月5日  
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌73巻  
臨時増刊号」に発表

(71)出願人 000214272

長瀬産業株式会社

大阪府大阪市西区新町1丁目1番17号

(72)発明者 芦内 誠

高知県南国市物部乙200-4 南国住宅1  
-204

(72)発明者 味園 春雄

高知県香美郡野市町みどり野東2-11

(72)発明者 左右田 健次

京都府宇治市小幡御蔵山45-61

(74)代理人 100104673

弁理士 南條 博道

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸の製造方法

(57)【要約】

【課題】 ポリ- $\gamma$ -D, L-グルタミン酸の新たな製造方法を提供すること。

【解決手段】 本発明により取得したポリ- $\gamma$ -L-グルタミン酸(L-PGA)またはポリ- $\gamma$ -D, L-グルタミン酸(PGA)の製造に関与する遺伝子(pgsB, pgsC, pgsA)を用いた組換え宿主を培養することにより、L-PGAまたはPGAを効率よく生産する。本質的にPGAを生産することのない異種微生物でもPGAが効率的に生産される。特に、グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を共存させると、D-グルタミン酸の含有率が上昇する。これらの遺伝子系を利用する組換え発現系では、従来の納豆菌の発酵法と比較して、PGA製造における質と量を調整できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に記載の塩基配列、または配列番号1中のアミノ酸に対応する塩基配列を有する、ポリ-γ-グルタミン酸またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸の生産に関与する遺伝子。

【請求項2】 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する酵素、または配列番号2のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、ポリ-γ-グルタミン酸またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸生産活性を有する酵素をコードする遺伝子。

【請求項3】 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する酵素、または配列番号3のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、ポリ-γ-グルタミン酸またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸生産活性を有する酵素をコードする遺伝子。

【請求項4】 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する酵素、または配列番号4のアミノ酸配列と55%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、ポリ-γ-グルタミン酸またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸生産活性を有する酵素をコードする遺伝子。

【請求項5】 請求項2、3および4の各酵素をコードする遺伝子を有し、ポリ-γ-グルタミン酸またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸生産活性を発現する遺伝子。

【請求項6】 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、ポリ-γ-グルタミン酸またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸生産活性を有する酵素。

【請求項7】 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、ポリ-γ-グルタミン酸またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸生産活性を有する酵素。

【請求項8】 配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列と55%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、ポリ-γ-グルタミン酸またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸生産活性を有する酵素。

【請求項9】 請求項1または請求項5の遺伝子を有するプラスミド。

【請求項10】 請求項1または請求項5の遺伝子とグルタミン酸ラセマーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子とを有するプラスミド。

【請求項11】 請求項9に記載のプラスミドで形質転換された、微生物。

【請求項12】 請求項10に記載のプラスミドで形質転換された、微生物。

【請求項13】 請求項1または請求項5の遺伝子を有するプラスミドと、グルタミン酸ラセマーゼ活性を有する

アミノ酸配列をコードする遺伝子を有するプラスミドとで形質転換された、微生物。

【請求項14】 請求項11に記載の形質転換された微生物を培養する工程を含む、ポリ-γ-グルタミン酸の製造方法。

【請求項15】 請求項11ないし13いずれかの項に記載の形質転換された微生物を培養する工程を含む、ポリ-γ-D、L-グルタミン酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリ-γ-グルタミン酸（以下、L-PGAという）、またはポリ-γ-D、L-グルタミン酸（以下、PGAという）の生産に関する遺伝子、この遺伝子にコードされるL-PGAまたはPGAの生産活性を有する酵素、この遺伝子とグルタミン酸ラセマーゼ活性を有する遺伝子とを用いて、効率よくL-PGAまたはPGAを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】納豆は、古くから、動物性タンパク質が得難い地域では、貴重なタンパク源として重宝され、最近では、健康食品としても注目されている。この納豆に独特の風味を与える重要な成分として、納豆の糸と呼ばれる粘性物質がある。この粘性物質は、主に、D-およびL-グルタミン酸が共重合したポリ-γ-D、L-グルタミン酸（PGA）からなり、納豆菌（*Bacillus subtilis* (natto)）により生産される。このPGAは、生分解性に優れているため、バイオポリマーとしての利用、例えば、食品、化粧品、工業用原料、薬剤等への利用が考えられる。

【0003】他方で、他の*Bacillus*属の微生物も粘性物質を生産する。例えば、炭疽菌*Bacillus anthracis*においては、毒性発現の機構と相俟って夾膜合成（炭疽毒anthraxとポリ-γ-D-グルタミン酸を主成分として含む）に関与する遺伝子が単離されている（*Journal of Bacteriology*, vol.171, P.722-730, 1989）。しかし、ポリ-γ-D-グルタミン酸の生産に病原微生物あるいはその遺伝子を用いるのは問題であること、D-体のホモポリマーは結晶性が高く、プラスチック材料への利用が期待されるものの生分解を受け難いと考えられること、および吸水性材料としては適当でない等の問題点がある。このように、D-グルタミン酸のホモポリマーであるポリ-γ-D-グルタミン酸は、生分解性のポリマー材料としては使用に適しないものである。

【0004】一方、L-グルタミン酸のホモポリマーであるL-PGAは、結晶性が高いと推定されるが生分解性が高いと思われるので、生分解性プラスチック用に利用できること、また、PGAはD、L体のコポリマーであり、吸水性にも優れるという特長を有し、さらに生分解性にも優れていると考えられること、さらに食用に供

されているため、安全であるという点を考慮すると、最も好ましい生分解性プラスチックの材料であるといえる。そこで、これらのL-PGAおよびPGAの新たな生産方法が望まれており、遺伝子工学的手法もその新規な生産方法の一つである。

【0005】ところで、最近、食品微生物ではないが、広く実験微生物として使用されている枯草菌*Bacillus subtilis* 168株の全ゲノム配列が公表された(Nature vol. 390, p.249-256, 1997)。そのテーブルには、炭疽菌*Bacillus anthracis*のポリ-γ-D-グルタミン酸合成に関与するcap遺伝子群と高い相同性を有する配列が記載されている。しかし、*B. subtilis* 168株はポリグルタミン酸非生産株と考えられており(Agric. Biol. Chem. Vol. 46, p.2275-2281, 1982)、その遺伝子産物が*B. subtilis* 168株内で正しく合成され、かつ機能しているかどうかは解析されておらず、仮に機能していたとしても、PGA生産に応用できるほどの活性を有しているとは考えにくい。さらに、ポリ-γ-グルタミン酸が生じるとしても、D体またはL体のホモポリマーであるのか、D、L-体のコポリマー(すなわち、PGA)であるのかも全く不明である。

【0006】以上のような状況下、安全性が保証されている食品微生物をL-PGAまたはPGAの遺伝子源として用い、遺伝子工学的手法を適用して、効率的なL-PGAあるいはPGAを生産する方法が望まれている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、L-PGAまたはPGA生産に関する遺伝子およびその遺伝子を用いる効率的なPGAの製造方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、配列表の配列番号1に記載の塩基配列、または配列番号1中のアミノ酸に対応する塩基配列を有する、L-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子に関する。

【0009】本発明は、また、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する酵素(以下、PgsBという)、または配列番号2のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、L-PGAまたはPGA生産活性を有する酵素(以下、PgsB様酵素という)をコードする遺伝子に関する。

【0010】本発明は、また、配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する酵素(以下、PgsCという)、または配列番号3のアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、L-PGAまたはPGA生産活性を有する酵素(以下、PgsC様酵素という)をコードする遺伝子に関する。

【0011】本発明は、さらに、配列表の配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する酵素(以下、PgsAという)、または配列番号4のアミノ酸配列と55%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、L-PGAまたは

PGA生産活性を有する酵素(以下、PgsA様酵素という)をコードする遺伝子に関する。

【0012】また、本発明は、前記各酵素をコードする遺伝子を有し、L-PGAまたはPGA生産活性を発現する遺伝子に関する。

【0013】さらに本発明は、PgsB、およびPgsB様酵素に関する。

【0014】また、本発明は、PgsC、およびPgsC様酵素に関する。

【0015】さらに、本発明は、PgsA、およびPgsA様酵素に関する。

【0016】また、本発明は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子、または、PgsBあるいはPgsB様酵素、PgsCあるいはPgsC様酵素、およびPgsAあるいはPgsA様酵素をコードする配列を有する遺伝子を有するプラスミドに関する。

【0017】また、本発明は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子、または、PgsBあるいはPgsB様酵素、PgsCあるいはPgsC様酵素、およびPgsAあるいはPgsA様酵素をコードする配列を有する遺伝子を有するプラスミドで形質転換された微生物に関する。

【0018】さらに本発明は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子、または、PgsBあるいはPgsB様酵素、PgsCあるいはPgsC様酵素、およびPgsAあるいはPgsA様酵素をコードする配列を有する遺伝子を有するプラスミドで形質転換された微生物を培養する工程を含む、L-PGA(ポリ-γ-L-グルタミン酸)の製造方法に関する。

【0019】また、本発明は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子、またはPgsBあるいはPgsB様酵素、PgsCあるいはPgsC様酵素、およびPgsAあるいはPgsA様酵素をコードする配列を有する遺伝子と、グルタミン酸ラセマーゼをコードする配列を有する遺伝子と、を有するプラスミドに関する。

【0020】また、本発明は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子、またはPgsBあるいはPgsB様酵素、PgsCあるいはPgsC様酵素、およびPgsAあるいはPgsA様酵素をコードする配列を有する遺伝子と、グルタミン酸ラセマーゼをコードする配列を有する遺伝子と、を有するプラスミドで形質転換された微生物に関する。

【0021】さらに本発明は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子、またはPgsBあるいはPgsB様酵素、PgsCあるいはPgsC様酵素、およびPgsAあるいはPgsA様酵素をコードする配列を有する遺伝子を有するプラスミドと、グルタミン酸ラセマーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子を有するプラスミドとで形質転換された微生物に関する。

る。

【0022】また、本発明は、PGAの生産に関与する遺伝子とグルタミン酸ラセマーゼ活性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子とを導入された上記2種類の微生物を培養する工程を含む、L-PGAまたはPGAの製造方法に関する。

【0023】

【発明の実施の形態】本明細書において、L-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子とは、例えば、グルタミン酸の $\alpha$ 位のカルボン酸を活性化し、グルタミン酸同士を結合する等の反応を通して、L-PGAまたはPGAを生産する遺伝子をいう。

【0024】本発明のL-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子は、配列表の配列番号1の塩基配列を有する。この配列番号1の中には、5'側から順に、配列番号2、配列番号3、および配列番号4のアミノ酸配列を有する3種類の酵素（それぞれ、順にPgsB、PgsCおよびPgsAという）がコードされている。PGAの生産に関与する遺伝子が、遺伝子コドンの縮重により、配列番号1とは異なる塩基配列を有し得ることは、当業者に周知である。従って、配列は異なるが、コードするアミノ酸は同じである配列も、本発明のL-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子に含まれる。

【0025】なお、少なくとも、PgsB、PgsCおよびPgsAの3種類の酵素は、L-PGAまたはPGAの生産に必須である。

【0026】本発明は、また、L-PGAまたはPGA生産活性を有する酵素をコードする遺伝子に関する。本明細書において、L-PGAまたはPGA生産活性を有する酵素とは、例えば、グルタミン酸の $\alpha$ 位のカルボン酸を活性化し、グルタミン酸同士を結合する等の、PGAの生産に関与する酵素を意味し、PgsB、PgsCおよびPgsAが含まれる。

【0027】本発明は、さらに、PgsB、PgsCおよびPgsAと相同であり、かつ、PGA生産活性を有する酵素をコードする遺伝子（それぞれ、PgsB様酵素、PgsC様酵素およびPgsA様酵素をコードする遺伝子という）も含まれる。

【0028】PgsBは、*Bacillus anthracis*由来のCapBと67%のアミノ酸の相同性を有しているにすぎないので、PgsB様酵素およびその遺伝子は、*Bacillus anthracis*由来のCapBと区別される。

【0029】PgsCは、*Bacillus anthracis*由来のCapCと77%のアミノ酸の相同性を有しているため、PgsC様酵素およびその遺伝子は、*Bacillus anthracis*由来のCapCと区別される。

【0030】PgsAは、*Bacillus anthracis*由来のCapAと49%のアミノ酸の相同性を有しているにすぎないので、PgsA様酵素およびその遺伝子は、*Bacillus anthracis*由来のCapAと区別される。

【0031】なお、相同性が100%のときは、PgsB様酵素、PgsC様酵素およびPgsA様酵素は、それぞれPgsB、PgsC、およびPgsAである。

【0032】また、本発明の遺伝子は、PgsB様酵素、PgsC様酵素およびPgsA様酵素をコードする配列を有する。この遺伝子が発現したときに、L-PGAまたはPGA生産活性を発現する。

【0033】本発明の遺伝子を取得するには、後述の実施例に示すようなショットガンクローニングを行っても良いし、本発明で開示された配列に基づいてプローブを作成し、当業者に周知のPCR法等の遺伝子組換えの技法を用いてもよい。

【0034】取得した遺伝子は、当業者に周知の方法でDNA配列を決定することができる。さらに、DNAの置換によるアミノ酸の置換も公知であり、部位特異的突然変異法等の方法で、1又は2以上の塩基配列、アミノ酸の改変（置換）を行うことができる。また、アミノ酸の欠失、付加による変異も当業者に周知であり、欠失、付加による場合でも、元の配列とアラインしたときに対応するアミノ酸の相同性が上記の程度かそれ以上であり、かつ、L-PGAまたはPGAの生産活性を有していれば、本発明に含まれることはいうまでもない。

【0035】改変された遺伝子は、微生物に導入して、L-PGAまたはPGAの生産を確認することにより、目的の改変が行われたか否かを決定することができる。

【0036】得られた遺伝子は、常法により、ベクターあるいはプラスミド（以下、単にプラスミドという）に組み込まれる。本発明においては、配列番号1に記載の遺伝子、あるいは、配列番号2、3、および4と上記相同性を有する3種類の配列とが用いられる。

【0037】本発明に用いられるプラスミドには、特に制限がない。当業者が通常用いる、宿主に適合するプラスミドを選択して用いればよい。異なる宿主間で発現するシャトルベクターは、当業者に周知である。

【0038】プラスミドへの目的遺伝子の導入も、当業者が用いる適切な方法で行われる。PGAの生産に関与する遺伝子の発現のために、プロモーター領域を同時にクローニングしてもよいし、プロモーター領域の下流にクローニングしてもよい。

【0039】本発明において、PGAの生産に関与する遺伝子とともに、グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子（以下、glrという）を有する方が、PGAの生産には好ましい。glr遺伝子を有するプラスミドを別途加えてもよいし、PGAの生産に関与する遺伝子と同じプラスミド上にglr遺伝子を組み込んでもよい。glr遺伝子が存在することにより、細胞内のL-グルタミン酸がD-グルタミン酸に変換され、PGAの生産に利用されやすくなるからである。なお、glrは、配列番号5のアミノ酸配列を有している。この配列は、芦内ら(J. Biochem. 123, 1156-1163 (1998))に記載されている。

【0040】L-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子を有するプラスミド、L-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子とglr遺伝子とを有するプラスミド、並びにL-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子を有するプラスミドとglr遺伝子を有するプラスミドとを宿主へ導入することも、当業者が用いる適切な方法で行われる。この方法は、例えば、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション、プロトプラスト法、コトランスフォーメーション法などとして知られている。

【0041】本発明に用いられる宿主としては、特に制限がなく、原核細胞、真核細胞（酵母、糸状菌、植物細胞、動物細胞、昆虫細胞などが挙げられる。増殖速度などを考慮すると、大腸菌（*E. coli*）、枯草菌（*Bacillus*）などの原核生物、あるいは、真核生物の酵母などの微生物が好ましい。

【0042】形質転換株を、当業者が用いる適切な手段、例えば、薬剤耐性などのマーカーを用いて選択し、もともとL-PGAまたはPGA生産をしない宿主であればL-PGAまたはPGAが生産されるか否か、あるいはPGAを生産する宿主であればPGAの生産量の向上などで、目的の遺伝子が導入されたか否かが決定される。

【0043】L-PGAまたはPGAの生産には、L-グルタミン酸を培地に加えて培養することが好ましい。L-グルタミン酸を生産する変異株を宿主として用いてもよい。

【0044】なお、もともとglr遺伝子を有する宿主に、L-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子が導入された場合、宿主は、PGAを生産する。他方で、L-PGAを生産させるには、glr遺伝子を欠失した宿主を準備する必要がある。例えば、宿主として大腸菌を用いてL-PGAを生産させる場合には、大腸菌が本来有しているglr遺伝子を破壊した変異株などを用いる。遺伝子破壊の方法は公知である。glr遺伝子を破壊（欠失）した変異株を宿主とし、本発明のL-PGAまたはPGAの生産に関与する遺伝子を導入した後、該宿主の生育に必要最小限で、かつ、菌体内にD-グルタミン酸が残存しない量のD-グルタミン酸を用いて一次培養し、菌体を生育させる。ついで、L-グルタミン酸の存在下、培養することにより、L-PGAが生産される。この場合、残存するD-グルタミン酸の影響で、D-グルタミン酸が混入することが有り得るが、実質的に純粋な（例えば、純度99%以上のL-グルタミン酸を含む）L-PGAが生産される。

【0045】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこの実施例に限定されない。

【0046】（遺伝子ライブラリーの作製）バシラス・サチルス（*Bacillus subtilis*）IFO3336株から、常法により染色体DNAを調製した。得られた染色

体DNA10μgに1ユニットの制限酵素Sau3AI（宝酒造製）を加えて37℃、10分処理した。得られた部分分解染色体DNA断片を電気泳動し、約3-8KbのDNA断片を回収した。クローニングベクターpUC19をBamHIで切断し、これに回収したDNA断片を組み込んで、大腸菌に形質転換した。50μg/mlのアンピシリンを含有するLB培地で生育したコロニーを集め、遺伝子ライブラリーを作製した。さらに、芦内ら（*J. Biochem.*, 123, 1156-1163 (1998)）の記載に基づいて、バシラス・サチルスの染色体DNAをTspEI（東洋紡社製）で部分分解し、これより約1-3 kbの断片を分離後pUC19のEcoRIサイトに組み込んで、比較的短いDNA断片を含む遺伝子ライブラリーもあわせて作製した。両ライブラリーを用いてPGA合成に関与する遺伝子のクローニングを行った。

【0047】（PGA生産形質転換株の選択）50μg/mlのアンピシリン、10mMのL-グルタミン酸、および10mMのクエン酸を含むM9培地（pH7.0）をPGA合成確認用液体培地として用いた。遺伝子ライブラリーの各クローンをPGA合成確認用液体培地5mlに植菌し、37℃で培養し、600nmにおける吸光度（以下、OD）が0.7に達したときに、IPTGを終濃度1mMとなるように加えて、さらに24時間培養し、培養終了時点での生育が遅い株（OD=1.0）を選択した。なお、通常の培養では、OD=2.5～2.8に到達する。

【0048】選択した生育の遅い株の培養液を遠心分離（8,000×g、1時間）して菌体を除去し、上清に3倍量のエタノールを加えて4℃、1時間放置し、遠心分離して沈殿を回収した。これを200μlのトリス塩酸緩衝液（pH8.5）に溶解し、20μlをゲル濃度5%のSDS-PAGEに供した。電気泳動後、ゲルをメチレンブルーで染色し、ポリグルタミン酸に相当するバンドの有無を調べた。陽性バンドが検出された培養液の沈殿物を、島津製作所製のHydrolysis Station AHST-1を用いて、6N塩酸で、真空下105℃、8時間、加水分解し、凍結乾燥して0.2mlの水に溶解し、ダイセル製のCHIRALPAK MA（+）（4.6×50mm）を用いて分析したところ、D-グルタミン酸とL-グルタミン酸が検出された。なお、大腸菌はPGAを生産しない。

【0049】陽性バンドを呈したクローンからプラスミドDNAを抽出し、パーキンエルマー社製のPRISMキットを用い、アプライドバイオシステムズ社製のDNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定したところ、配列番号1に記載の配列を有していた。配列番号1の配列には、3つの蛋白質がコードされており、それぞれ、順に、pgsB（配列番号2）、pgsC（配列番号3）およびpgsA（配列番号4）と命名した。PgsBはCapBと67%、PgsCはCapBと77%、Pg

sAはCapAと49%のアミノ酸の相同性を有していた。

【0050】(PGA発現ベクターの構築) 得られたPGAの生産に関与する遺伝子を有するプラスミドをNcoIとBamHIで切断し、NcoIとBamHIとで消化したプラスミドpTrc99A (ファルマシア社製、スウェーデン) に組み込んで、pPGS1を作製した。pPGS1は、lacIのコントロール下、トリプトファンプロモーターの下流に、pgsB、pgsC、およびpgsA遺伝子を有しており、IPTGの添加により発現する。図1にプラスミドpPGS1の模式図を示す。

【0051】(グルタミン酸ラセマーゼ(glr) 遺伝子を有するベクターの作製) 他方で芦内ら(J. Biochem. 123, 1156-1163 (1998)) の記載に基づいて、上記バシラス・サチルスIFO3336株から得られた染色体DNAを用いて、PCR法により、glr遺伝子を単離した。この配列は、配列番号5のアミノ酸配列を有していた。glr遺伝子を有する配列をpMW219 (ニッポンジーン社製) のBamHI-EcoRI部位に導入し、プラスミドpBSGR3を得た。プラスミドpBSGR3の模式図を、図2に示す。glr遺伝子は、ラクトースプロモーターの下流(コントロール下) にあり、IPTGの添加により発現する。

【0052】(形質転換体の調製) プラスミドpPGS1を単独で、および、プラスミドpPGS1とプラスミドpBSGR3とを混合して、常法により大腸菌(E. coli) JM109を形質転換し、プラスミドpPGS1を有するE. coli JM109/pPGS1と、プラスミドpPGS1とプラスミドpBSGR3とを有するE. coli JM109/pPGS1+pBSGR3とを得た。

【0053】(PGAの発現) E. coli JM109/pPGS1は、アンピシリン50 $\mu$ g/mlを含有するLB培地400ml (pH7.5) に、E. coli JM109/pPGS1+pBSGR3は、アンピシリン50 $\mu$ g/mlとカナマイシン25 $\mu$ g/mlを含有するLB培地400ml (pH7.5) に、それぞれ植菌した。コントロールとしてプラスミドpTrc99Aを含有するE. coli JM109/pTrc99Aを用いた。37℃で培養後、600nmの吸光度が2.1に達した時点で集菌し、200mlの0.14MのNaCl溶液で洗浄し、20mlの0.14MのNaCl溶液に再懸濁した。半分を遠心分離して集め、凍結乾燥した。乾燥重量で40mgの菌体量であった。

【0054】残りの40mgの細胞を含有する懸濁液を100mlのPGA培地に植菌した。PGA培地は、50mMのL-グルタミン酸塩、MSビタミン溶液(JRHバイオサイエンス、カンザス、米国)、1mM MgSO<sub>4</sub>、または1mM MnSO<sub>4</sub>、0.14mM Na

Clおよび上記抗生物質を含み、pHは、7.5であった。

【0055】移行後、28℃、1時間インキュベートとしてL-グルタミン酸塩を取り込ませた。ついで、1mMのIPTG (宝酒造社製) を懸濁液に加えて、28℃、27時間培養した。

【0056】12,000 $\times$ gで1時間遠心分離して、上清を回収した。200mlの0.14mMのNaCl溶液で沈澱物を洗浄、遠心分離し、得られた上清(洗浄液)を上清と併せて保存し、反応液とした。なお、細胞の乾燥重量にほとんど変化がなかったので、培養期間中、細胞の増殖はなかった。

【0057】Kubotaらの方法(Bioc. Biotechnol. Biochem. 57:1212-1213(1993)) に基づいて、反応液からPGAを単離した。反応液のpHを硫酸で3.0に調整した後、4℃で12時間、攪拌した。その後、3倍量のエタノールを加えて沈澱を得、この沈澱を、10mlの0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に25℃で溶解し、2Lの0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に対して、25℃、一晚、透析した。

【0058】透析液を凍結乾燥し、1mlの0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解して、12,000 $\times$ gで1時間遠心分離し、20 $\mu$ g/mlのプロテインナーゼK (宝酒造社製) で、37℃、12時間インキュベートして、 $\alpha$ -ポリペプチドを除いた。得られた溶液を2Lの蒸留水に対して3回、25℃で、一昼夜透析し、12,000 $\times$ gで1時間遠心分離した。この溶液を凍結乾燥し、乾燥物をPGAとして用いた。

【0059】得られたPGAサンプルを1mlの蒸留水に溶解し、10 $\mu$ lをゲル濃度5%~15%の直線濃度勾配を有するSDS-PAGE (バイオラッド社製、バイオラッドmini-Protein II Ready Gel J) に供し、電気泳動後、ゲルをメチレンブルーで染色し、ポリグルタミン酸に相当するバンドの有無を調べた。図3に結果を示す。コントロールのE. coli JM109/pTrc99Aであるレーン1および2ではバンドが検出されなかったのに対し、形質転換株ではいずれもバンドが検出された。なお、図3において、分子量標準蛋白質マーカーとして、ミオシン(212kDa)、 $\alpha$ 2-マクログロブリン(170kDa)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(116kDa)、トランスフェリン(76kDa)およびグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(53kDa)を用いた。

【0060】得られたPGAサンプルの50 $\mu$ gを、島津製作所製のHydrolysis Station A HST-1を用いて、6N塩酸で、真空下105℃、8時間、加水分解し、凍結乾燥して0.2mlの水に溶解し、ダイセル製のCHIRALPAK MA (+) (4.6 $\times$ 50mm)を用いて分析したところ、D-グルタミン酸とL-グルタミン酸が検出された。

【0061】以上の結果 (PGAの収量、PGAの分析値) を、表1に示す。

【0062】

【表1】

大腸菌クローン	金属イオン	PGA 乾燥重量 (mg)	含量(%)	
			D-体	L-体
JM109/pTrc99A	Mn <sup>2+</sup>	---	---	---
	Mg <sup>2+</sup>	---	---	---
JM109/pPGS1	Mn <sup>2+</sup>	1.6	16	84
	Mg <sup>2+</sup>	0.2	12	88
JM109/pPGS1+pBSGR3	Mn <sup>2+</sup>	2.5	68	32
	Mg <sup>2+</sup>	1.0	66	34

【0063】表1から明らかなように、pPGS1を含有する大腸菌 (E. coli JM109/pPGS1 と、E. coli JM109/pPGS1+pBSGR3) は、いずれもPGAを生産した。glr遺伝子を有するプラスミドpBSGR3を有するE. coli JM109/pPGS1+pBSGR3は、PGAの収量も高く、D体の含量も高いことがわかり、プラスミドpPGS1とプラスミドpBSGR3PGAとを有することにより、PGAが効率よく生産できることが示された。

【0064】なお、金属イオンとしては、マグネシウムよりもマンガンの方が、PGAの生産に効果があることが示された。

【0065】

【発明の効果】本発明により取得したポリ-γ-L-グルタミン酸 (L-PGA) またはポリ-γ-D, L-グルタミン酸 (PGA) の製造に関する遺伝子 (pgsB、pgsC、pgsA) を用いた組換え宿主を培養することにより、L-PGAまたはPGAが効率よく生産される。本質的にPGAを生産することのない異種微生物でもPGAが効率的に生産される。特に、グルタミン酸ラセマーゼ遺伝子を共存させると、D-グルタミン酸の含有率が上昇する。これらの遺伝子系を利用する組換え発現系は、従来の納豆菌の発酵法と比較し、PGA製造における質と量を調整できる。

【0066】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nagase & Co., Ltd

<120> A method for producing poly-gamma-D,L- glutamic acid.

<130> P199N08072

<160> 5

<210> 1

<211> 3047

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis IF0 3336

<400> 1

```

aggagatgtc gaaaagca atg tgg tta ctc att ata gcc tgt gct gtc ata      51
              Met Trp Leu Leu Ile Ile Ala Cys Ala Val Ile
                1              5              10
ctg gtc atc gga ata tta gaa aaa cga cga cat cag aaa aac att gat      99
Leu Val Ile Gly Ile Leu Glu Lys Arg Arg His Gln Lys Asn Ile Asp
              15              20              25
gcc ctc cct gtt cgg gtg aat att aac ggc atc cgc gga aaa tcg act      147
Ala Leu Pro Val Arg Val Asn Ile Asn Gly Ile Arg Gly Lys Ser Thr
              30              35              40
gtg aca agg ctg aca acc gga ata tta ata gaa gcc ggt tac aag act      195
Val Thr Arg Leu Thr Thr Gly Ile Leu Ile Glu Ala Gly Tyr Lys Thr
              45              50              55
gtt gga aaa aca aca gga aca gat gca aga atg att tac tgg gac aca      243
Val Gly Lys Thr Thr Gly Thr Asp Ala Arg Met Ile Tyr Trp Asp Thr
              60              65              70              75

```

```

ccg gag gaa aag ccg att aaa cgg aaa cct cag ggg ccg aat atc gga 291
Pro Glu Glu Lys Pro Ile Lys Arg Lys Pro Gln Gly Pro Asn Ile Gly
      80      85      90
gag caa aaa gaa gtc atg aga gaa aca gta gaa aga ggg gct aac gcg 339
Glu Gln Lys Glu Val Met Arg Glu Thr Val Glu Arg Gly Ala Asn Ala
      95      100      105
att gtc agt gaa tgc atg gct gtt aac cca gat tat caa atc atc ttt 387
Ile Val Ser Glu Cys Met Ala Val Asn Pro Asp Tyr Gln Ile Ile Phe
      110      115      120
cag gaa gaa ctt ctg cag gcc aat atc ggc gtc att gtg aat gtt tta 435
Gln Glu Glu Leu Leu Gln Ala Asn Ile Gly Val Ile Val Asn Val Leu
      125      130      135
gaa gac cat atg gat gtc atg ggg ccg acg ctt gat gaa att gca gaa 483
Glu Asp His Met Asp Val Met Gly Pro Thr Leu Asp Glu Ile Ala Glu
      140      145      150      155
gcg ttt acc gct aca att cct tat aat ggc cat ctt gtc att aca gat 531
Ala Phe Thr Ala Thr Ile Pro Tyr Asn Gly His Leu Val Ile Thr Asp
      160      165      170
agt gaa tat acc gag ttc ttt aaa caa aaa gca aaa gaa cga aac aca 579
Ser Glu Tyr Thr Glu Phe Phe Lys Gln Lys Ala Lys Glu Arg Asn Thr
      175      180      185
aaa gtc atc att gct gat aac tca aaa att aca gat gag tat tta cgt 627
Lys Val Ile Ile Ala Asp Asn Ser Lys Ile Thr Asp Glu Tyr Leu Arg
      190      195      200
aaa ttt gaa tac atg gta ttc cct gat aac gct tct ctg gcg ctg ggt 675
Lys Phe Glu Tyr Met Val Phe Pro Asp Asn Ala Ser Leu Ala Leu Gly
      205      210      215
gtg gct caa gca ctc ggc att gac gaa gaa aca gca ttt aag gga atg 723
Val Ala Gln Ala Leu Gly Ile Asp Glu Glu Thr Ala Phe Lys Gly Met
      220      225      230      235
ctg aat gcg ccg cca gat ccg gga gca atg aga att ctt ccg ctg atc 771
Leu Asn Ala Pro Pro Asp Pro Gly Ala Met Arg Ile Leu Pro Leu Ile
      240      245      250
agt ccg agc gag cct ggg cac ttt gtt aat ggg ttt gcc gca aac gac 819
Ser Pro Ser Glu Pro Gly His Phe Val Asn Gly Phe Ala Ala Asn Asp
      255      260      265
gct tct tct act ttg aat ata tgg aaa cgt gta aaa gaa atc ggt tac 867
Ala Ser Ser Thr Leu Asn Ile Trp Lys Arg Val Lys Glu Ile Gly Tyr
      270      275      280
ccg acc gat gat ccg atc atc atc atg aac tgc cgc gca gac cgt gtc 915
Pro Thr Asp Asp Pro Ile Ile Ile Met Asn Cys Arg Ala Asp Arg Val
      285      290      295
gat cgg aca cag caa ttc gca aat gac gta ttg cct tat att gaa gca 963
Asp Arg Thr Gln Gln Phe Ala Asn Asp Val Leu Pro Tyr Ile Glu Ala
      300      305      310      315
agt gaa ctg atc tta atc ggt gaa aca aca gaa ccg atc gta aaa gcc 1011
Ser Glu Leu Ile Leu Ile Gly Glu Thr Thr Glu Pro Ile Val Lys Ala
      320      325      330
tat gaa gaa ggc aaa att cct gca gac aaa ctg cat gat cta gag tat 1059
Tyr Glu Glu Gly Lys Ile Pro Ala Asp Lys Leu His Asp Leu Glu Tyr

```



335	340	345	
aaa tca aca gat gaa att atg gaa ttg tta aag aaa aga atg cac aac	1107		
Lys Ser Thr Asp Glu Ile Met Glu Leu Leu Lys Lys Arg Met His Asn			
350	355	360	
cgt gtc ata tat ggc gtc ggc aat att cat ggt gcc gca gag cct tta	1155		
Arg Val Ile Tyr Gly Val Gly Asn Ile His Gly Ala Ala Glu Pro Leu			
365	370	375	
att gaa aaa atc cac gaa tac aag gta aag cag ctc gta agc tag ggg	1203		
Ile Glu Lys Ile His Glu Tyr Lys Val Lys Gln Leu Val Ser *			
380	385	390	393
gaaatgcaga c atg ttc gga tca gat tta tac atc gca cta att tta ggt	1253		
Met Phe Gly Ser Asp Leu Tyr Ile Ala Leu Ile Leu Gly			
1	5	10	
gta cta ctc agt tta att ttt gcg gaa aaa aca ggg atc gtg ccg gca	1301		
Val Leu Leu Ser Leu Ile Phe Ala Glu Lys Thr Gly Ile Val Pro Ala			
15	20	25	
gga ctg gtt gta ccg gga tat tta gga ctt gcg ttt aat cag ccg gtc	1349		
Gly Leu Val Val Pro Gly Tyr Leu Gly Leu Ala Phe Asn Gln Pro Val			
30	35	40	45
ttt att tta ctt gtt ttg cta gtg agc ttg ctc acg tat gtt atc gtg	1397		
Phe Ile Leu Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Leu Thr Tyr Val Ile Val			
50	55	60	
aaa tac ggt tta tcc aaa ttt atg att ttg tac gga cgc aga aaa ttt	1445		
Lys Tyr Gly Leu Ser Lys Phe Met Ile Leu Tyr Gly Arg Arg Lys Phe			
65	70	75	
gct gcc atg ctg ata aca ggg atc gtc cta aaa atc gcg ttt gat ttt	1493		
Ala Ala Met Leu Ile Thr Gly Ile Val Leu Lys Ile Ala Phe Asp Phe			
80	85	90	
cta tac ccg att gta cca ttt gaa atc gca gaa ttt cga gga atc ggc	1541		
Leu Tyr Pro Ile Val Pro Phe Glu Ile Ala Glu Phe Arg Gly Ile Gly			
95	100	105	
atc atc gtg cca ggt tta att gcc aat acc att cag aaa caa ggt tta	1589		
Ile Ile Val Pro Gly Leu Ile Ala Asn Thr Ile Gln Lys Gln Gly Leu			
110	115	120	125
acc att acg ttc gga agc acg ctg cta ttg agc gga cgc acc ttt gct	1637		
Thr Ile Thr Phe Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ser Gly Ala Thr Phe Ala			
130	135	140	
atc atg ttt gtt tac tac tta att taa tgtaaggtgt gtcaaacg atg aaa	1688		
Ile Met Phe Val Tyr Tyr Leu Ile *		Met Lys	
145	149	1	
aaa gaa ctg agc ttt cat gaa aag ctg cta aag ctg aca aaa cag caa	1736		
Lys Glu Leu Ser Phe His Glu Lys Leu Leu Lys Leu Thr Lys Gln Gln			
5	10	15	
aaa aag aaa acc aat aag cac gta ttt att gcc att ccg atc gtt ttt	1784		
Lys Lys Lys Thr Asn Lys His Val Phe Ile Ala Ile Pro Ile Val Phe			
20	25	30	
gtc ctt atg ttc gct ttc atg tgg gcg gga aaa gcg gaa acg ccg aag	1832		
Val Leu Met Phe Ala Phe Met Trp Ala Gly Lys Ala Glu Thr Pro Lys			
35	40	45	50
gtc aaa acg tat tct gac gac gta ctc tca gcc tca ttt gta ggc gat	1880		

Val Lys Thr Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ser Ala Ser Phe Val Gly Asp	
55 60 65	
att atg atg gga cgc tat gtt gaa aaa gta acg gag caa aaa ggg gca	1928
Ile Met Met Gly Arg Tyr Val Glu Lys Val Thr Glu Gln Lys Gly Ala	
70 75 80	
gac agt att ttt caa tat gtt gaa ccg atc ttt aga gcc tcg gat tat	1976
Asp Ser Ile Phe Gln Tyr Val Glu Pro Ile Phe Arg Ala Ser Asp Tyr	
85 90 95	
gta gca gga aac ttt gaa aac ccg gta acc tat caa aag aat tat aaa	2024
Val Ala Gly Asn Phe Glu Asn Pro Val Thr Tyr Gln Lys Asn Tyr Lys	
100 105 110	
caa gca gat aaa gag att cat ctg cag acg aat aag gaa tca gtg aaa	2072
Gln Ala Asp Lys Glu Ile His Leu Gln Thr Asn Lys Glu Ser Val Lys	
115 120 125 130	
gtc ttg aag gat atg aat ttc acg gtt ctc aac agc gca aac aac cac	2120
Val Leu Lys Asp Met Asn Phe Thr Val Leu Asn Ser Ala Asn Asn His	
135 140 145	
gca atg gat tac ggc gtt cag ggc atg aaa gat acg ctt gga gaa ttt	2168
Ala Met Asp Tyr Gly Val Gln Gly Met Lys Asp Thr Leu Gly Glu Phe	
150 155 160	
gcg aag caa aac ctt gat atc gtt gga gcg gga tac agc tta agt gat	2216
Ala Lys Gln Asn Leu Asp Ile Val Gly Ala Gly Tyr Ser Leu Ser Asp	
165 170 175	
gcg aaa aag aaa att tcg tac caa aaa gtc aac ggg gta acg att gcg	2264
Ala Lys Lys Lys Ile Ser Tyr Gln Lys Val Asn Gly Val Thr Ile Ala	
180 185 190	
acg ctt ggc ttt acc gat gtg tcc ggg aaa ggt ttc gcg gct aaa aaa	2312
Thr Leu Gly Phe Thr Asp Val Ser Gly Lys Gly Phe Ala Ala Lys Lys	
195 200 205 210	
aat acg ccg ggc gtg ctg ccc gca gat cct gaa att ttc atc cct atg	2360
Asn Thr Pro Gly Val Leu Pro Ala Asp Pro Glu Ile Phe Ile Pro Met	
215 220 225	
att tca gaa gcg aaa aaa cat gct gac att gtt gtt gtg cag tca cac	2408
Ile Ser Glu Ala Lys Lys His Ala Asp Ile Val Val Val Gln Ser His	
230 235 240	
tgg ggc caa gag tat gac aat gat cca aac gac cgc cag cgc cag ctt	2456
Trp Gly Gln Glu Tyr Asp Asn Asp Pro Asn Asp Arg Gln Arg Gln Leu	
245 250 255	
gca aga gcc atg tct gat gcg gga gct gac atc atc gtc ggc cat cat	2504
Ala Arg Ala Met Ser Asp Ala Gly Ala Asp Ile Ile Val Gly His His	
260 265 270	
ccg cac gtc tta gaa ccg att gaa gta tat aac gga acc gtc att ttc	2552
Pro His Val Leu Glu Pro Ile Glu Val Tyr Asn Gly Thr Val Ile Phe	
275 280 285 290	
tac agc ctc ggc aac ttt gtc ttt gac caa ggc tgg acg aga aca aga	2600
Tyr Ser Leu Gly Asn Phe Val Phe Asp Gln Gly Trp Thr Arg Thr Arg	
295 300 305	
gac agt gca ctg gtt cag tat cac ctg aag aaa aat gga aca ggc cgc	2648
Asp Ser Ala Leu Val Gln Tyr His Leu Lys Lys Asn Gly Thr Gly Arg	
310 315 320	

```

ttt gaa gtg aca ccg atc gat atc cat gaa gcg aca cct gca cct gtg 2696
Phe Glu Val Thr Pro Ile Asp Ile His Glu Ala Thr Pro Ala Pro Val
      325              330              335
aaa aaa gac agc ctt aaa cag aaa acc att att cgc gaa ctg acg aaa 2744
Lys Lys Asp Ser Leu Lys Gln Lys Thr Ile Ile Arg Glu Leu Thr Lys
      340              345              350
gac tct aat ttc gct tgg aaa gta gaa gac gga aaa ctg acg ttt gat 2792
Asp Ser Asn Phe Ala Trp Lys Val Glu Asp Gly Lys Leu Thr Phe Asp
355              360              365              370
att gat cat agt gac aaa cta aaa tct aaa taa acggagtgat aaaga 2840
Ile Asp His Ser Asp Lys Leu Lys Ser Lys *
      375              380
tgaaatttgt caaagctatc tggccgtttg ttgccgtagc catcgtgttc atgtttatgt 2900
cagcttttaa attcaatgat cagctgacag atcaggaaaa acagaagatt gatatggaaa 2960
tgaataaaat ccaacagcag gaagaaccgg taaacgccaa taaataattc aaaaaagaga 3020
gtgtctgatg agacactctc ttttt 3045
<;210>; 2
<;211>; 1182
<;212>; DNA
<;213>; Bacillus subtilis IFO 3336
<;400>; 2
atg tgg tta ctc att ata gcc tgt gct gtc ata ctg gtc atc gga ata 48
Met Trp Leu Leu Ile Ile Ala Cys Ala Val Ile Leu Val Ile Gly Ile
      1              5              10              15
tta gaa aaa cga cga cat cag aaa aac att gat gcc ctc cct gtt cgg 96
Leu Glu Lys Arg Arg His Gln Lys Asn Ile Asp Ala Leu Pro Val Arg
      20              25              30
gtg aat att aac ggc atc cgc gga aaa tcg act gtg aca agg ctg aca 144
Val Asn Ile Asn Gly Ile Arg Gly Lys Ser Thr Val Thr Arg Leu Thr
      35              40              45
acc gga ata tta ata gaa gcc ggt tac aag act gtt gga aaa aca aca 192
Thr Gly Ile Leu Ile Glu Ala Gly Tyr Lys Thr Val Gly Lys Thr Thr
      50              55              60
gga aca gat gca aga atg att tac tgg gac aca ccg gag gaa aag ccg 240
Gly Thr Asp Ala Arg Met Ile Tyr Trp Asp Thr Pro Glu Glu Lys Pro
      65              70              75              80
att aaa cgg aaa cct cag ggg ccg aat atc gga gag caa aaa gaa gtc 288
Ile Lys Arg Lys Pro Gln Gly Pro Asn Ile Gly Glu Gln Lys Glu Val
      85              90              95
atg aga gaa aca gta gaa aga ggg gct aac gcg att gtc agt gaa tgc 336
Met Arg Glu Thr Val Glu Arg Gly Ala Asn Ala Ile Val Ser Glu Cys
      100              105              110
atg gct gtt aac cca gat tat caa atc atc ttt cag gaa gaa ctt ctg 384
Met Ala Val Asn Pro Asp Tyr Gln Ile Ile Phe Gln Glu Glu Leu Leu
      115              120              125
cag gcc aat atc ggc gtc att gtg aat gtt tta gaa gac cat atg gat 432
Gln Ala Asn Ile Gly Val Ile Val Asn Val Leu Glu Asp His Met Asp
      130              135              140
gtc atg ggg ccg acg ctt gat gaa att gca gaa gcg ttt acc gct aca 480
Val Met Gly Pro Thr Leu Asp Glu Ile Ala Glu Ala Phe Thr Ala Thr

```

```

145          150          155          160
att cct tat aat ggc cat ctt gtc att aca gat agt gaa tat acc gag 528
Ile Pro Tyr Asn Gly His Leu Val Ile Thr Asp Ser Glu Tyr Thr Glu

          165          170          175
ttc ttt aaa caa aaa gca aaa gaa cga aac aca aaa gtc atc att gct 576
Phe Phe Lys Gln Lys Ala Lys Glu Arg Asn Thr Lys Val Ile Ile Ala

          180          185          190
gat aac tca aaa att aca gat gag tat tta cgt aaa ttt gaa tac atg 624
Asp Asn Ser Lys Ile Thr Asp Glu Tyr Leu Arg Lys Phe Glu Tyr Met

          195          200          205
gta ttc cct gat aac gct tct ctg gcg ctg ggt gtg gct caa gca ctc 672
Val Phe Pro Asp Asn Ala Ser Leu Ala Leu Gly Val Ala Gln Ala Leu

          210          215          220
ggc att gac gaa gaa aca gca ttt aag gga atg ctg aat gcg ccg cca 720
Gly Ile Asp Glu Glu Thr Ala Phe Lys Gly Met Leu Asn Ala Pro Pro

          225          230          235          240
gat ccg gga gca atg aga att ctt ccg ctg atc agt ccg agc gag cct 768
Asp Pro Gly Ala Met Arg Ile Leu Pro Leu Ile Ser Pro Ser Glu Pro

          245          250          255
ggg cac ttt gtt aat ggg ttt gcc gca aac gac gct tct tct act ttg 816
Gly His Phe Val Asn Gly Phe Ala Ala Asn Asp Ala Ser Ser Thr Leu

          260          265          270
aat ata tgg aaa cgt gta aaa gaa atc ggt tac ccg acc gat gat ccg 864
Asn Ile Trp Lys Arg Val Lys Glu Ile Gly Tyr Pro Thr Asp Asp Pro

          275          280          285
atc atc atc atg aac tgc cgc gca gac cgt gtc gat cgg aca cag caa 912
Ile Ile Ile Met Asn Cys Arg Ala Asp Arg Val Asp Arg Thr Gln Gln

          290          295          300
ttc gca aat gac gta ttg cct tat att gaa gca agt gaa ctg atc tta 960
Phe Ala Asn Asp Val Leu Pro Tyr Ile Glu Ala Ser Glu Leu Ile Leu

          305          310          315          320
atc ggt gaa aca aca gaa ccg atc gta aaa gcc tat gaa gaa ggc aaa 1008
Ile Gly Glu Thr Thr Glu Pro Ile Val Lys Ala Tyr Glu Glu Gly Lys

          325          330          335
att cct gca gac aaa ctg cat gat cta gag tat aaa tca aca gat gaa 1056
Ile Pro Ala Asp Lys Leu His Asp Leu Glu Tyr Lys Ser Thr Asp Glu

          340          345          350
att atg gaa ttg tta aag aaa aga atg cac aac cgt gtc ata tat ggc 1104
Ile Met Glu Leu Leu Lys Lys Arg Met His Asn Arg Val Ile Tyr Gly

          355          360          365
gtc ggc aat att cat ggt gcc gca gag cct tta att gaa aaa atc cac 1152
Val Gly Asn Ile His Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ile Glu Lys Ile His

          370          375          380
gaa tac aag gta aag cag ctc gta agc tag 1182
Glu Tyr Lys Val Lys Gln Leu Val Ser *

          385          390          393

```

&lt;;210&gt;; 3

&lt;;211&gt;; 450

&lt;;212&gt;; DNA

<;213>; *Bacillus subtilis* IF0 3336

&lt;;400&gt;; 3

```

atg ttc gga tca gat tta tac atc gca cta att tta ggt gta cta ctc 48
Met Phe Gly Ser Asp Leu Tyr Ile Ala Leu Ile Leu Gly Val Leu Leu
   1           5           10          15
agt tta att ttt gcg gaa aaa aca ggg atc gtg ccg gca gga ctg gtt 96
Ser Leu Ile Phe Ala Glu Lys Thr Gly Ile Val Pro Ala Gly Leu Val
           20           25           30
gta ccg gga tat tta gga ctt gcg ttt aat cag ccg gtc ttt att tta 144
Val Pro Gly Tyr Leu Gly Leu Ala Phe Asn Gln Pro Val Phe Ile Leu
           35           40           45
ctt gtt ttg cta gtg agc ttg ctc acg tat gtt atc gtg aaa tac ggt 192
Leu Val Leu Leu Val Ser Leu Leu Thr Tyr Val Ile Val Lys Tyr Gly
           50           55           60
tta tcc aaa ttt atg att ttg tac gga cgc aga aaa ttt gct gcc atg 240
Leu Ser Lys Phe Met Ile Leu Tyr Gly Arg Arg Lys Phe Ala Ala Met
           65           70           75           80
ctg ata aca ggg atc gtc cta aaa atc gcg ttt gat ttt cta tac ccg 288
Leu Ile Thr Gly Ile Val Leu Lys Ile Ala Phe Asp Phe Leu Tyr Pro
           85           90           95
att gta cca ttt gaa atc gca gaa ttt cga gga atc ggc atc atc gtg 336
Ile Val Pro Phe Glu Ile Ala Glu Phe Arg Gly Ile Gly Ile Ile Val
           100          105          110
cca ggt tta att gcc aat acc att cag aaa caa ggt tta acc att acg 384
Pro Gly Leu Ile Ala Asn Thr Ile Gln Lys Gln Gly Leu Thr Ile Thr
           115          120          125
ttc gga agc acg ctg cta ttg agc gga gcg acc ttt gct atc atg ttt 432
Phe Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ser Gly Ala Thr Phe Ala Ile Met Phe
           130          135          140
gtt tac tac tta att taa 450
Val Tyr Tyr Leu Ile *
145          149

```

&lt;;210&gt;; 4

&lt;;211&gt;; 1143

&lt;;212&gt;; DNA

<;213>; *Bacillus subtilis* IFO 3336

&lt;;400&gt;; 4

```

atg aaa aaa gaa ctg agc ttt cat gaa aag ctg cta aag ctg aca aaa 48
Met Lys Lys Glu Leu Ser Phe His Glu Lys Leu Leu Lys Leu Thr Lys
   1           5           10          15
cag caa aaa aag aaa acc aat aag cac gta ttt att gcc att ccg atc 96
Gln Gln Lys Lys Lys Thr Asn Lys His Val Phe Ile Ala Ile Pro Ile
           20           25           30
gtt ttt gtc ctt atg ttc gct ttc atg tgg gcg gga aaa gcg gaa acg 144
Val Phe Val Leu Met Phe Ala Phe Met Trp Ala Gly Lys Ala Glu Thr
           35           40           45
ccg aag gtc aaa acg tat tct gac gac gta ctc tca gcc tca ttt gta 192
Pro Lys Val Lys Thr Tyr Ser Asp Asp Val Leu Ser Ala Ser Phe Val
           50           55           60
ggc gat att atg atg gga cgc tat gtt gaa aaa gta acg gag caa aaa 240
Gly Asp Ile Met Met Gly Arg Tyr Val Glu Lys Val Thr Glu Gln Lys

```

65	70	75	80	
ggg gca gac agt att ttt caa tat gtt gaa ccg atc ttt aga gcc tcg	288			
Gly Ala Asp Ser Ile Phe Gln Tyr Val Glu Pro Ile Phe Arg Ala Ser				
	85	90	95	
gat tat gta gca gga aac ttt gaa aac ccg gta acc tat caa aag aat	336			
Asp Tyr Val Ala Gly Asn Phe Glu Asn Pro Val Thr Tyr Gln Lys Asn				
	100	105	110	
tat aaa caa gca gat aaa gag att cat ctg cag acg aat aag gaa tca	384			
Tyr Lys Gln Ala Asp Lys Glu Ile His Leu Gln Thr Asn Lys Glu Ser				
	115	120	125	
gtg aaa gtc ttg aag gat atg aat ttc acg gtt ctc aac agc gca aac	432			
Val Lys Val Leu Lys Asp Met Asn Phe Thr Val Leu Asn Ser Ala Asn				
	130	135	140	
aac cac gca atg gat tac ggc gtt cag ggc atg aaa gat acg ctt gga	480			
Asn His Ala Met Asp Tyr Gly Val Gln Gly Met Lys Asp Thr Leu Gly				
	145	150	155	160
gaa ttt gcg aag caa aac ctt gat atc gtt gga gcg gga tac agc tta	528			
Glu Phe Ala Lys Gln Asn Leu Asp Ile Val Gly Ala Gly Tyr Ser Leu				
	165	170	175	
agt gat gcg aaa aag aaa att tcg tac caa aaa gtc aac ggg gta acg	576			
Ser Asp Ala Lys Lys Lys Ile Ser Tyr Gln Lys Val Asn Gly Val Thr				
	180	185	190	
att gcg acg ctt ggc ttt acc gat gtg tcc ggg aaa ggt ttc gcg gct	624			
Ile Ala Thr Leu Gly Phe Thr Asp Val Ser Gly Lys Gly Phe Ala Ala				
	195	200	205	
aaa aaa aat acg ccg ggc gtg ctg ccc gca gat cct gaa att ttc atc	672			
Lys Lys Asn Thr Pro Gly Val Leu Pro Ala Asp Pro Glu Ile Phe Ile				
	210	215	220	
cct atg att tca gaa gcg aaa aaa cat gct gac att gtt gtt gtg cag	720			
Pro Met Ile Ser Glu Ala Lys Lys His Ala Asp Ile Val Val Val Gln				
	225	230	235	240
tca cac tgg ggc caa gag tat gac aat gat cca aac gac cgc cag cgc	768			
Ser His Trp Gly Gln Glu Tyr Asp Asn Asp Pro Asn Asp Arg Gln Arg				
	245	250	255	
cag ctt gca aga gcc atg tct gat gcg gga gct gac atc atc gtc ggc	816			
Gln Leu Ala Arg Ala Met Ser Asp Ala Gly Ala Asp Ile Ile Val Gly				
	260	265	270	
cat cat ccg cac gtc tta gaa ccg att gaa gta tat aac gga acc gtc	864			
His His Pro His Val Leu Glu Pro Ile Glu Val Tyr Asn Gly Thr Val				
	275	280	285	
att ttc tac agc ctc ggc aac ttt gtc ttt gac caa ggc tgg acg aga	912			
Ile Phe Tyr Ser Leu Gly Asn Phe Val Phe Asp Gln Gly Trp Thr Arg				
	290	295	300	
aca aga gac agt gca ctg gtt cag tat cac ctg aag aaa aat gga aca	960			
Thr Arg Asp Ser Ala Leu Val Gln Tyr His Leu Lys Lys Asn Gly Thr				
	305	310	315	320
ggc cgc ttt gaa gtg aca ccg atc gat atc cat gaa gcg aca cct gca	1008			
Gly Arg Phe Glu Val Thr Pro Ile Asp Ile His Glu Ala Thr Pro Ala				
	325	330	335	

cct gtg aaa aaa gac agc ctt aaa cag aaa acc att att cgc gaa ctg 1056  
 Pro Val Lys Lys Asp Ser Leu Lys Gln Lys Thr Ile Ile Arg Glu Leu  
 340 345 350  
 acg aaa gac tct aat ttc gct tgg aaa gta gaa gac gga aaa ctg acg 1104  
 Thr Lys Asp Ser Asn Phe Ala Trp Lys Val Glu Asp Gly Lys Leu Thr  
 355 360 365  
 ttt gat att gat cat agt gac aaa cta aaa tct aaa taa 1143  
 Phe Asp Ile Asp His Ser Asp Lys Leu Lys Ser Lys \*  
 370 375 380  
 <210>; 5  
 <211>; 1020  
 <212>; DNA  
 <213>; Bacillus subtilis IF0 3336  
 <400>; 5  
 ttg gaa caa cca ata gga gtc att gat tcc ggg gtt ggc ggt tta acc 60  
 Met Glu Gln Pro Ile Gly Val Ile Asp Ser Gly Val Gly Gly Leu Thr  
 1 5 10 15  
 gtt gcg aag gaa atc atg aga cag cta cct aaa gaa aat att atc tac 120  
 Val Ala Lys Glu Ile Met Arg Gln Leu Pro Lys Glu Asn Ile Ile Tyr  
 20 25 30  
 gtc ggg gat acg aaa cgg tgt cct tat ggt ccg cgc cct gaa gaa gag 180  
 Val Gly Asp Thr Lys Arg Cys Pro Tyr Gly Pro Arg Pro Glu Glu Glu  
 35 40 45  
 gtg ctt caa tat acg tgg gag ctg acg aat tat tta ctc gaa aac cac 240  
 Val Leu Gln Tyr Thr Trp Glu Leu Thr Asn Tyr Leu Leu Glu Asn His  
 50 55 60  
 cac atc aaa atg ctc gtg atc gcc tgt aat aca gca aca gcg atc gct 300  
 His Ile Lys Met Leu Val Ile Ala Cys Asn Thr Ala Thr Ala Ile Ala  
 65 70 75 80  
 ttg gat gac atc cag cgc agc gtc ggc ata ccg gtg gtc gga gtc atc 360  
 Leu Asp Asp Ile Gln Arg Ser Val Gly Ile Pro Val Val Gly Val Ile  
 85 90 95  
 cag cct ggt gcg aga gca gcg ata aaa gtg acg gat aat cag cat atc 420  
 Gln Pro Gly Ala Arg Ala Ala Ile Lys Val Thr Asp Asn Gln His Ile  
 100 105 110  
 ggt gtc atc ggc aca gag aat acg att aag agc aat gca tac gaa gaa 480  
 Gly Val Ile Gly Thr Glu Asn Thr Ile Lys Ser Asn Ala Tyr Glu Glu  
 115 120 125  
 gcg ctt ttg gca tta aac cct gat ttg aag gtt gaa aac ctt gcc tgc 540  
 Ala Leu Leu Ala Leu Asn Pro Asp Leu Lys Val Glu Asn Leu Ala Cys  
 130 135 140  
 ccg ctg ctt gtg cct ttt gtg gaa agc ggg aag ttt ctc gac aaa aca 600  
 Pro Leu Leu Val Pro Phe Val Glu Ser Gly Lys Phe Leu Asp Lys Thr  
 145 150 155 160  
 gca gac gag att gtt aaa acc tcg ctg tat ccg tta aaa gac aca tca 660  
 Ala Asp Glu Ile Val Lys Thr Ser Leu Tyr Pro Leu Lys Asp Thr Ser  
 165 170 175  
 att gat tcg ctg att tta ggc tgc acc cat tac cct att tta aaa gaa 720  
 Ile Asp Ser Leu Ile Leu Gly Cys Thr His Tyr Pro Ile Leu Lys Glu  
 180 185 190

```

gcc att caa aga tat atg gga gag cac gta aac att att tgc tcc ggc      780
Ala Ile Gln Arg Tyr Met Gly Glu His Val Asn Ile Ile Ser Ser Gly
      195                200                205
gat gaa aca gcc cgg gaa gtc agc aca att ctc tct tat aaa ggg ctg      840
Asp Glu Thr Ala Arg Glu Val Ser Thr Ile Leu Ser Tyr Lys Gly Leu
      210                215                220
ctg aac cag tct cgg att gcc cgg gat cat cag ttc ctg aca aca ggg      900
Leu Asn Gln Ser Pro Ile Ala Pro Asp His Gln Phe Leu Thr Thr Gly
      225                230                235                240
gcg cgt gat cag ttt gca aaa atc gca gac gat tgg ttt ggc cat gaa      960
Ala Arg Asp Gln Phe Ala Lys Ile Ala Asp Asp Trp Phe Gly His Glu
      245                250                255
gtc ggg cat gtg gaa tgt atc tca ctg caa gaa ccg att aaa aga tag      1020
Val Gly His Val Glu Cys Ile Ser Leu Gln Glu Pro Ile Lys Arg
      260                265                270

```

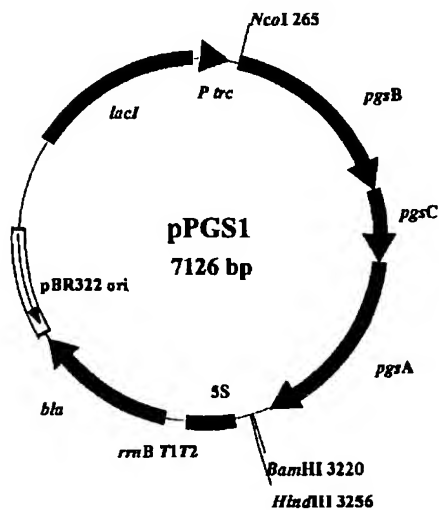
【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミドpPGS1の模式図である。

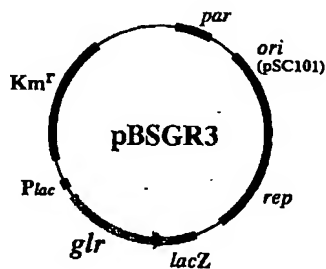
【図2】 プラスミドpBSGR3の模式図である。

【図3】 形質転換体のポリマー-D, L-グルタミン酸の生産を示す図である。

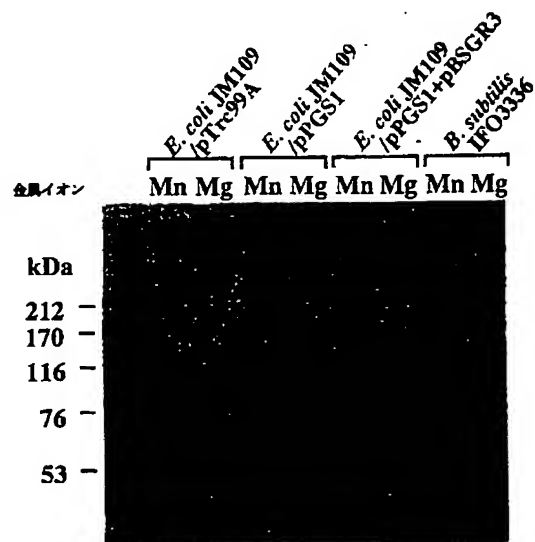
【図1】



【図2】



【図3】





フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード(参考)
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	9/00
	9/00		9/90
	9/90	C 1 2 P	13/14
C 1 2 P	13/14	C 1 2 N	5/00
			B
			A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 AA05 BA07 BA80  
CA03 DA06 EA04 GA11 GA19  
HA01  
4B050 CC03 DD02 LL05  
4B064 AG01 CA02 CA19 CB28 CC24  
CD11 DA01 DA10 DA16  
4B065 AA19Y AA26X AB01 AC14  
BA02 BA25 BB15 BC01 BD33  
CA24 CA27  
4J001 EA36 GA20 JA20